

한국 · 중국 · 일본 當歸의 HepG2 세포 독성 비교 연구

박완수 · 오명숙 · 장문석¹ · 양웅모 · 이병희 · 김원남 · 이학철² · 강순아³ · 박성규*

경희대학교 한의과대학 처방제형학교실, 1: 하버드대학교 의과대학 소아병원,
2: 동의대학교 한의과대학 예방의학교실, 3: 서울벤처정보대학원대학교 발효식품학과

Cytotoxicity of Angelicae Radix from Korea, China, and Japan on HepG2 Cells

Wansu Park, Myung Sook Oh, Mun Seog Chang¹, Woong Mo Yang, Byong Hee Lee, Won Nam Kim, Hak Chul Lee², Soon Ah Kang³, Seong Kyu Park*

Department of Prescriptionology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,

1: Department of Medicine, Division of Newborn Medicine, Children's Hospital and Harvard Medical School,

2: Department of Oriental Preventive Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University,

3: Department of Fermented Food Science, Seoul University of Venture & Information

The purpose of this study is to examine the cytotoxicity of species of Angelica (Angelicae Radix; the root of Angelica gigas Nakai, A. sinensis (Oliv.) Diels, and A. acutiloba Kitag.) on HepG2 cells. The water extracts of roots of Angelica gigas (WAG), A. sinensis (WAS), and A. acutiloba (WAA) were studied for HepG2 cell viability by a modified MTT assay in the concentrations of 5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml for 24, 48, 72 h. WAG and WAS did not reduced the cell viability significantly. But WAA reduced the cell viability in the concentration of 500 ug/ml for 24 h (85.45%), 48 h (75.01%). In conclusion, WAG and WAS have not the significant cytotoxicity on HepG2 cells in the suitable dose.

Key words : Angelicae Radix, HepG2 cells, cytotoxicity, MTT assay

서 론

當歸는 미나리과 (Umbelliferae)에 속한 다년생 초본인 참당귀 Angelica gigas Nakai의 뿌리를 건조시킨 것으로 Angelicae Gigantis Radix로 불리기도 한다. 늦가을부터 이듬해 봄 새싹이 돋기 전에 뿌리를 캐내어 줄기와 잎을 제거하고 진흙을 제거한 뒤, 통풍이 잘 되는 그늘에서 여러 날 건조하여 사용한다. 중국에서는 A. sinensis (Oliv.) Diels를 사용하며 일본에서는 A. acutiloba Kitag.를 이용하고 있다. 當歸의 외형적 모양은 굵고 짧은 주된 뿌리로부터 줄기 및 잎의 흔적이 남아 있는 모습이 보이며 주근의 길이는 약 3-7cm, 직경은 2-5cm이고 지근의 길이는 15-20cm 정도이다. 바깥 면의 색깔은 엷은 황갈색 혹은 흑갈색이며 주근과 지근에는 세로 주름이 많으나 간혹 주근에는 가로 주름이 있는 것도 있다. 절단면은 평탄하고 나무부위와 껍질부위의 구별이 뚜렷하며

목부와 형성층 부근의 피부는 어두운 황색이지만 나머지 부분은 주로 백색을 띠고 있다¹⁾. 當歸의 주성분은 pyranocoumarin계인 decursin이며 그 밖에 decursinol, umbelliferon, β-sitosterol 등을 함유한다. 性味는 甘辛하며 毒性이 없고²⁾, 歸經은 心肝脾經으로 補血和血, 行氣止痛, 潤燥滑腸의 효능이 있으며 眩暈을 치료한다고 하였다³⁾. 참당귀의 성분 중 decursin은 PKC를 활성화하는 작용으로 항암활성이 있는 것으로 보고되었다⁴⁾. 當歸가 들어간 처방으로는 四物湯, 當歸補血湯, 歸附丸, 當歸丸, 當歸苦參丸, 當歸頭散, 當歸芍藥散, 當歸建中湯 등이 있다¹⁾.

본 연구에서는 위와 같이 한의학의 치료 약물로서 중요한 위치를 차지하고 있는 當歸에 대한 간세포 독성을 알아보기 위하여 한국·중국·일본 當歸의 물 추출물로 세포 독성 유발 실험을 실시하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

- 1. 재료
1) 시약 및 기기

* 교신저자 : 박성규, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학

· E-mail : comskp@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-0330

· 접수 : 2006/08/18 · 수정 : 2006/09/08 · 채택 : 2006/10/04

본 실험에 사용된 시약 중 Tetrazolium salt 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 Dimethyl Sulfoxide (DMSO)는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 각 시약의 품질은 분석용 등급 이상의 것으로 하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Eyela, Japan), freeze dryer (Eyela, Japan), deep freezer (Revco, USA), microplate spectrophotometer (Molecular Devices, USA), CO₂ incubator (Sanyo, Japan) 등이다.

2) 약재

본 실험에 사용된 當歸는 한국 當歸 *Angelica gigas* Nakai, 중국 當歸 *A. sinensis* Diels, 일본 當歸 *A. acutiloba* Kitag.의 건조된 뿌리부분으로서 서울특별시 동대문구 제기동 경동약령시장에 소재한 원광약업사를 통하여 구입하여 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실에서 외부형태를 비교 조사하였으며, 일부는 경희대학교 한의과대학 처방제형학교실에 보관하였다.

3) 시료의 제조

한국·중국·일본 當歸를 각 50g씩 정확하게 중량을 측정하여 환류추출기에 1차 증류수 1,000ml와 함께 넣은 뒤 탱액이 끓는 시점으로부터 2시간동안 가열, 추출하였다. 추출액을 filter paper로 감압 여과한 뒤, 여과액을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 동결건조기를 이용하여 건조한 후 시료로 사용하였다.

2. 방법

1) Cell line

실험에 사용된 간조직 세포는 HepG2 (human hepatoma cell line)로서 한국 세포주 은행 (KCLB, Korea)에서 구입하였다.

2) 세포 배양

HepG2 cells은 37℃, 5% CO₂ 조건에서 10% FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양되었다. HepG2 cells은 75 cm² flask (Falcon, USA)에서 충분히 증식된 후 배양 3일 간격으로 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (Sigma, USA) 용액으로 씻어준 후 50 ml flask 당 1 ml의 0.25 % trypsin-EDTA용액을 넣고 실온에서 1분간 처리한 다음 trypsin용액을 버리고 37 °C에서 5분간 보관하여 세포를 탈착하여 계대 배양하였다. 탈착된 세포는 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10 ml에 부유시킨 다음 새로운 배양용기에 옮겨 1 : 20의 split ratio로 CO₂ 배양기 (37 °C, 5 % CO₂)에서 배양하였다.

3) MTT assay

한국·중국·일본 當歸가 HepG2 cells에 나타내는 세포독성 유발 효과를 알아보기 위하여 Mosmann⁵⁾, Kotnik^{6,7)} 등의 방법을 응용하였다. 96 well plate에 1×10⁴ cells/well의 cell을 100 µl씩 넣고 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간동안 배양한 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/mL을 각 well에 처리하고 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나기 4시간 전에 PBS에 녹인 5 mg/mL MTT (Sigma, USA)를 20 µl씩 각 well에 처리한 후 알루미늄호일로 차광시킨 후 나머지 시간 동안 같은 조건에서 배양하였다.

배양액을 모두 제거한 후 DMSO를 100 µl 처리하고 37℃에서 2 시간 방치 후 microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 다음 공식으로 계산되었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 \times \text{AT} / \text{AC}, \text{AC- absorbance of control, AT- absorbance of tested extract solution.}$$

3. 통계처리

실험성적은 평균치 ± 표준오차 (Mean ± S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 각 실험군과의 평균의 차이는 ANOVA test로 분석하여 p < 0.05일 때 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. HepG2 cells에 대한 한국 當歸 물 추출물 (WAG)의 세포 독성

WAG의 HepG2 cells에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml의 범위에 대하여 24, 48, 72 시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 WAG가 처리된 군과 정상군과의 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

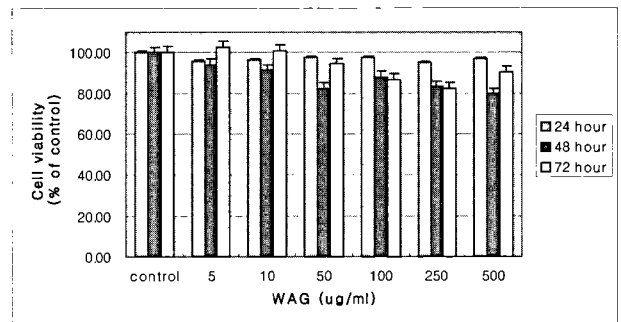


Fig. 1. Effect of water extract of root of *Angelica gigas* Nakai (WAG) on HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the presence or absence of WAG at 37°C for 24 h or 48 h or 72 h. Each column represents mean ± S.E. (n=10) with respect to 100% of control.

2. HepG2 cells에 대한 중국 當歸 물 추출물 (WAS)의 세포 독성

WAS의 HepG2 cells에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 µg/ml의 범위에 대하여 24, 48, 72 시간 동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 WAS가 처리된 군과 정상군과의 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 2).

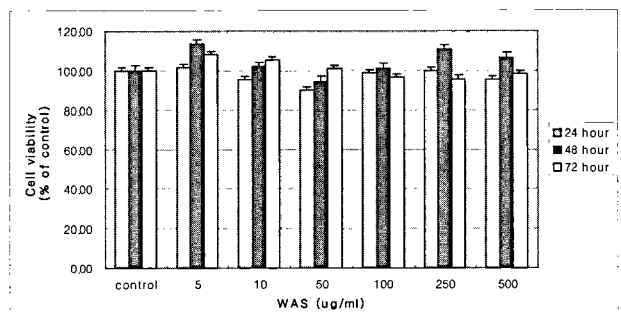


Fig. 2. Effect of water extract of root of *Angelica sinensis* Diels (WAS) on HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the presence or absence of WAS at 37°C for 24 h or 48 h or 72 h. Each column represents mean ± S.E. (n=10) with respect to 100% of control.

3. HepG2 cells에 대한 일본 當歸 물 추출물 (WAA)의 세포 독성
WAA의 HepG2 cells에 대한 세포 독성을 측정하기 위하여 시료 5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml의 범위에 대하여 24, 48, 72 시간동안 배양한 후 세포 생존율을 측정한 결과 500 ug/ml의 농도로 24, 48시간 동안 처리한 군이 대조군보다 각각 85.45%, 75.01%로 유의하게 ($p < 0.05$) 감소하였다 (Fig. 3).

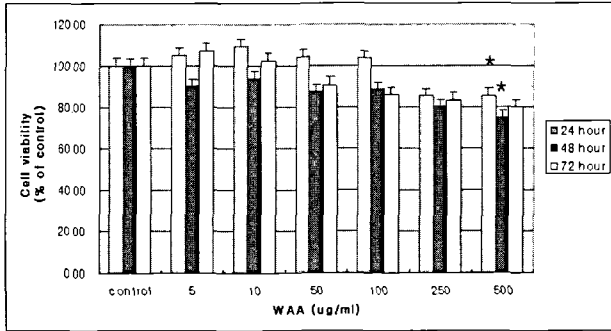


Fig. 3. Effect of water extract of root of *Angelica acutiloba* Kitag. (WAA) on HepG2 cells. HepG2 cells were incubated in the presence or absence of WAA at 37°C for 24 h or 48 h or 72 h. Each column represents mean \pm S.E. (n=10) with respect to 100% of control (*: $p < 0.05$).

고찰

當歸는 산형과 (Umbelliferae: 미나리과)에 속한 여러해살이 풀인 참당귀 *Angelica gigas* Nakai의 건조된 뿌리로서 한의학의 주요한 치료약물로 사용되고 있다. 채취 시기는 늦가을부터 이듬해 봄 새싹이 돋기 전이 적당한 것으로 알려져 있다. 국내에서는 참당귀 전초를 뿌리까지 캐내어 줄기와 잎을 제거하고 진흙을 제거한 뒤, 통풍이 잘 되는 그늘에서 여러 날 건조하여 사용하고 있으며, 중국에서는 *A. sinensis* (Oliv.) Diels, 일본에서는 *A. acutiloba* Kitag. 大和當歸를 當歸로 쓰고 있다. 當歸의 異名으로는 乾歸, 馬尾當歸, 秦歸, 馬尾歸 등이 있다.

當歸 외형적 모양은 굵고 짧은 주된 뿌리로부터 줄기 및 잎의 흔적이 남아 있는 모습이 보이며 주근의 길이는 약 3-7cm, 직경은 2-5cm이고 지근의 길이는 15-20cm 정도이다. 바깥 면의 색깔은 엷은 황갈색 혹은 흑갈색이며 주근과 지근에는 세로 주름이 많으나 간혹 주근에는 가로 주름이 있는 것도 있다. 절단면은 평탄하고 나무부위와 껍질부위의 구별이 뚜렷하며 목부와 형성층 부근의 피부는 어두운 황색이지만 나머지 부분은 주로 백색을 띠고 있다.

當歸의 주된 국내산지는 전라북도, 경상남도, 강원도, 경기도, 평안북도, 함경남도이다. 중국에서는 감숙성, 운남성 등의 지역에서 주로 산출되고 있고 그 외에 사천성, 협서성, 호북성, 귀주성 등의 지역에서도 생산되는 것으로 알려져 있으며 이 중 감숙성 지역에서의 약재 생산량이 가장 많으며 그 품질도 우수한 것으로 알려져 있다.

當歸는 味가 달고 매우며(甘辛), 性이 따듯하여(溫) 補血和血하며 調經止痛 및 潤燥滑腸하는 효능이 있어 血虛로 인한 頭痛, 眩暈, 痿痺, 赤痢後重과 月經不順, 無月經으로 인한 腹痛, 子宮出血, 癥瘕結聚 및 腸燥便秘, 癰疽瘡瘍, 타박상 등의 증상을 치료한

다⁸⁾. 當歸 치료 대상 병증의 주된 病因은 血虛인데 그 주요 증상은 蒼白 혹은 萎黃色의 얼굴색이 나타남과, 脣甲蒼白, 眩暈, 耳鳴, 目昏, 心悸, 失眠, 健忘 등이다. 이러한 血虛 증세를 개선 또는 제거하는 약물을 補血藥이라 하며, 當歸, 熟地黃, 白芍藥 등이 주요한 보혈약으로 분류된다.

當歸의 주성분은 pyranocoumarin계인 decursin이며 그 밖에 decursinol, umbelliferon, β -sitosterol, isoimperatorin, umbelliferone, angelinol, gigosol, prenyletin, nodakenin, decursinol, decursidin, choline, myrcene 등이 함유되어 있다. 한국 當歸의 성분 중 decursin은 PKC를 활성화하는 작용과 함께 항암 활성이 있는 것으로 보고되었다. 중국 當歸에는 휘발유가 0.4%-0.7% 함유되어 있으며 그 주요 성분은 butylidene phthalide, n-valerop-henone-o-carboxylic acid, vitamin B12, vitamin A이며 일본 當歸 (大和當歸)에는 ligustilide, bergapten, vitamin B12, β -sitosterol, nicotinic acid, folic acid, falcaindiol 등을 함유되어 있다.

當歸가 들어간 처방으로는 四物湯, 當歸補血湯, 歸附丸, 當歸丸, 當歸苦蔘丸, 當歸頭散, 當歸芍藥散, 當歸建中湯 등이 있다.

최근에 當歸補血湯이 cyclophosphamide로 유도된 환자의 빈혈에 미치는 영향에 대한 연구⁹⁾에서 현재 조절제로 널리 사용되고 있는 erythropoietin과 비교할 때 혈색소 농도, 적혈구수의 회복에서 일정한 회복효과가 있음이 증명되었고, 전신적인 건강상태의 지표인 체중회복에 대해서는 더욱 우수한 회복효과가 있어, 항암제 투여로 인한 빈혈 발생의 부작용 증상에 대하여 기존의 빈혈 치료제를 대체할 수 있는 한약 치료제로의 개발 가능성이 있음이 밝혀졌다.

이와 같이 血病의 主藥인 當歸가 인체에 흡수되었을 때 나타날 수 있는 간독성 (肝毒性) 유발 여부 연구를 위해 한국·중국·일본 當歸의 물 추출물로서 간 조직 세포인 HepG2 cells을 대상으로 MTT assay를 실시하여 세포생존율 측정 실험을 수행한 결과 한국 當歸 물 추출물 (WAG)과 중국 當歸 물 추출물 (WAS)에서는 처리 농도 (5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml)와 처리 시간 (24, 48, 72시간)에 관계없이 정상군에 비해 유의한 감소는 나타나지 않았으나 일본 當歸 물 추출물 (WAA)에서는 500ug/ml의 농도로 24, 48 시간 동안 처리한 군에서 정상군에 비해 각각 85.45%, 75.01%로 유의한 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$). 따라서 한국 當歸와 중국 當歸의 물 추출물은 500 ug/ml의 농도에서 HepG2 cells에 세포 독성이 없는 것으로 사료된다.

결론

한의학에서 중요한 치료 약물로 사용되고 있는 當歸의 간세포 독성을 알아보기 위하여 한국 當歸 물 추출물 (WAG), 중국 當歸 물 추출물 (WAS), 일본 當歸 물 추출물 (WAA)로 처리한 HepG2 cells의 세포생존율을 측정하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

WAG를 처리한 HepG2 cells의 세포 생존율 감소를 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 처리 농도 (5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml)와 처리 시간 (24, 48, 72시간)에 관계없이 유의

한 감소는 나타나지 않았다. WAS를 처리한 HepG2 cells의 세포 생존율 감소를 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 처리 농도 (5, 10, 50, 100, 250, 500 ug/ml)와 처리 시간 (24, 48, 72시간)에 관계없이 유의한 감소는 나타나지 않았다. WAA를 처리한 HepG2 cells의 세포생존율 감소를 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 500ug/ml의 농도로 24, 48시간 동안 처리한 군에서 정상군에 비해 각각 85.45%, 75.01%로 유의한 감소를 나타내었다 ($p < 0.05$).

이상의 결과에서 한국 當歸와 중국 當歸는 500 ug/ml의 최고농도에서 간세포 독성이 나타나지 않았음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050401-034-787-188-00-00)의 지원에 의해 이루어진 것임”

참고문헌

1. 전국한과의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울, 영림사, p 632, 634, 2004.

2. 黃奭緝. 神農本草經. 北京, 中醫古籍出版社, pp 169-172, 1991.
3. 吳大平. 論川芎藥性與臨床應用. 中醫學會報, p 44, 45, 1996.
4. Ahn, K.S., Sim, W.S., Kim, I.H. Decursin A cytotoxic agent and protein kinase C activator from the Root of *Angelica gigas*. *Planta Med.* 63(4):360-361, 1997.
5. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63, 1983.
6. Kotnik, V., Fleischmann, W.R. Jr. A simple and rapid method to determine hematopoietic growth factor activity. *J Immunol Methods.* 129(1):23-30, 1990.
7. Kumi-Diaka, J., Rodriguez, R., Goudaze, G. Influence of genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol Cell.* 90(4):349-354, 1998.
8. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海, 上海科學技術出版社, pp 893-904, 2974-2975, 1999.
9. 강순아, 장문석, 오명숙, 김도립, 김지숙, 박성규. 當歸補血湯과 erythropoietin이 cyclophosphamide로 유도된 흰쥐의 빈혈에 미치는 영향 비교 연구. *동의생리병리학회지* 20(1):31-36, 2006.